

무부하 백서에서 열 충격과 항산화물이 골성장판에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 정형외과학교실¹⁾, 인제대학교 의과대학 정형외과학교실²⁾박희원¹⁾ · 박건보²⁾ · 이기석¹⁾ · 김성훈¹⁾ · 김현우¹⁾

= Abstract =

Effects of Heat Shock and Antioxidant on the Growth Plate of Unloaded Rats**Hui Wan Park, M.D.¹⁾, Kun Bo Park, M.D.²⁾, Ki Seok Lee, M.D.¹⁾,
Sung Hoon Kim, M.D.¹⁾, Hyun Woo Kim, M.D.¹⁾***Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea¹⁾**Department of Orthopaedic Surgery, Inje University College of Medicine, Pusan, Korea²⁾*

Purpose: This study was performed to examine any histopathological changes occurring in the growth plate when the rats were subjected to be deprived of normal weight bearing using the hindlimb suspension model, and to search for any countermeasures for improving and/or recovering the chondrocyte activities within the growth plate.

Materials and Methods: Sixty male Sprague-Dawley rats, aged 6 weeks, were divided into 10 groups each: Group I-control to unloading; Group II-unloading 3 weeks only; Group III-unloading+application of heat shock; Group IV-unloading+application of antioxidant; Group V-unloading+application of heat shock and antioxidant; Group VI-control to reloading; Group VII-reloading 1 week only; Group VIII-reloading+application of heat shock; Group IX-reloading+application of antioxidant; Group X-reloading+application of heat shock and antioxidant. The animals were double labeled with 5-Bromo-2'-deoxydiuridin (BrdU) and BrdU immunohistochemistry was performed for the cellular kinetic analysis. Transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling (TUNEL) assay was done for the investigation of apoptotic changes in the growth plate, and the positive cells were counted in each zones of the growth plate in both TUNEL and BrdU immunohistochemistry. Heat shock protein (HSP), indian hedgehog (Ihh), and vascular endothelial growth factor (VEGF) were immunolocalized to assess the chondrocytic activities in terms of production of extracellular matrix protein.

Results: Non-weight bearing induced a reduction of height of the growth plate, reduced cellular proliferation of chondrocytes, reduced expression of Ihh and VEGF, and altered expression of heat shock protein. When heat

※ 통신저자: 김 현 우

서울특별시 서대문구 성산로 250

연세대학교 의과대학 정형외과학교실

TEL: 02) 2228-2187 FAX: 02) 363-1139 E-mail: pedhkim@yuhs.ac

접수일: 2010년 3월 12일, 게재확정일: 2010년 6월 10일

*본 연구는 연세대학교 의과대학 교수연구비(6-2004-1083)에 의해 수행되었음.

shock and/or antioxidant were applied to the unloaded and reloaded rats, only rats in the group of application of both heat shock and antioxidant showed normal cellular activities in terms of cellular proliferation and the production of extracellular matrix protein.

Conclusion: The present results suggest that application of heat shock and antioxidant would be a counter-measure for the restoration of chondrocytic activities when the normal weight-bearing is deprived of.

Key Words: Heat shock, Antioxidant, Chondrocyte, Growth plate, Unloaded rats

서 론

체중 부하가 감소되거나 결여되는 상황에 처할 경우 신체는 더 이상 정상적인 하중 스트레스를 받지 않게 되고 근수축단백질과 골 기질 소실에 의한 하지의 위축/약화현상이 발생한다. 부하를 받지 않는 골에서는 골량이 감소되는데 이를 조직 형태학적 검사를 통해 조사해 보면 골모세포 수의 감소, 피질골과 망상골의 골량 감소, 피질골에서의 골막 미네랄 형성 이상에 의한 골밀도 감소 등이 관찰된다^{9, 10, 18, 26, 28)}. 이들 골격계에서의 변화는 외상이나 여러 내, 외과적 질환으로 인해 침상 안정을 요하는 경우, 휠체어에 의존하는 장애인, 자율신경실조증 혹은 활동력이 떨어진 노인들에서 흔히 나타나는 병적 현상으로서 이를 극복하여 운동하고자 할 경우 갑자기 걸리게 될 부하를 견디기 힘들고 이미 비가역적인 변화가 초래된 경우 이로 인한 합병증 및 장애는 크다. 이와 같이 하중부하의 변화로 인한 신체의 병리현상과 그 적응과정을 충분히 이해함으로써 골격계에 대한 부작용을 최소화하거나 기능 저하를 억제할 수 있는 치유방법(countermeasures)을 모색하는 것은 중요한 현안이라 할 수 있다.

현재까지 체중부하의 감소로 인한 운동기관의 기능 저하를 억제할 수 있는 치유방법으로써 연구되어온 방법으로는 전통적인 운동요법, 전기치료법(functional electrical stimulation), 호르몬요법 등이 있으며^{4, 20)} 최근에는 열 충격(heat shock)이나 생리활성물질(bioactive materials)의 활용이 이러한 전통적 방법들에 대한 궁극적인 대안으로 주목받기 시작했다²⁾. 세포가 열 충격을 받게 되면 열충격단백질(heat shock protein, HSP) 발현이 유도되는데, 선행 연구들에 의하면 무부하 상태에 노출된 쥐에서 열 충격을 가하여

직장온도가 41.6℃에 이른 경우, 그렇지 못한 대조군에 비해 근위축이 현저히 줄어드는 것으로 알려졌다^{22, 24)}. 또한, 국소적인 열 충격에 노출될 경우 뼈의 재흡수 및 새로운 골 형성이 선택적으로 활성화된다고 하였다²⁷⁾. 그러나 문제는 열 충격에 노출될 경우 체내 대사율이 증가 된다는 사실이며 이는 세포내 활성산소(reactive oxygen species)의 생성을 증가시켜 세포의 손상 등 악영향을 미칠 가능성이 높아진다는 점이다¹⁶⁾. 한편 이런 상황에서 항산화제(antioxidant)를 투여한 경우 세포 손상을 줄일 수 있어 무부하 상태에서의 조직의 손상과 위축을 완화하였다는 연구 보고도 있었다¹⁾.

위와 같은 결과들을 종합해 보면, 열 충격이나 항산화제를 적용하는 것이 근, 골격계세포의 활성을 유지하고 세포내 주요 단백질들과 세포막의 손상을 억제시키는 하나의 대안이 될 수 있을 것이다. 그러나 골격계에 대한 과거 연구는 주로 체중 부하 결여에 의한 골다공증 혹은 골 소실과 관련된 뼈에서의 변화를 관찰하는데 치우쳐 왔으며, 실제로 동물 실험의 경우 인간보다 훨씬 빠른 골막내 골화를 보임으로 인해 그 실험 결과를 해석하고 이를 임상적으로 이용하는데 많은 어려움을 내포하고 있다. 또한 골 형성은 막내골화 뿐만 아니라 성장판에서 일어나는 연골내골화에 의해서도 조절되므로 이들에 대한 연구가 필수적이다.

본 연구에서는 첫째, 열 충격이 성장판내 연골세포의 활성 저하를 억제시키는 효과가 있는지를 검증하고자 하였고 둘째, 항산화제의 추가적인 적용이 열 충격과 더불어 세포 기능의 위축 억제효과를 더욱 높일 수 있는 지를 조사하였다. 이를 위해 HSP의 발현 정도와 세포기능 간의 상관관계, 항산화 작용과 세포기능 간의 상관관계 그리고 연골 형성과 관계되는 단백질의 발현과 세포손

상과의 관계 등을 분석함으로써 세포손상은 억제되면서 그 기능은 최대한 증가될 수 있는 조건을 찾고자하였다.

연구재료 및 방법

하지현수장치는 과거 본 연구자들이 사용하였던 흰쥐의 등과 꼬리를 고정하는 방법을 이용하였다 (Fig. 1)¹²⁾. 열 충격은 41℃ 온도 및 60~70%의 습도를 유지할 수 있는 chamber를 준비하고 해당 실험동물을 하지현수 상태에서 매번 1시간 동안 가하였다. Thermocouple을 이용하여 열 충

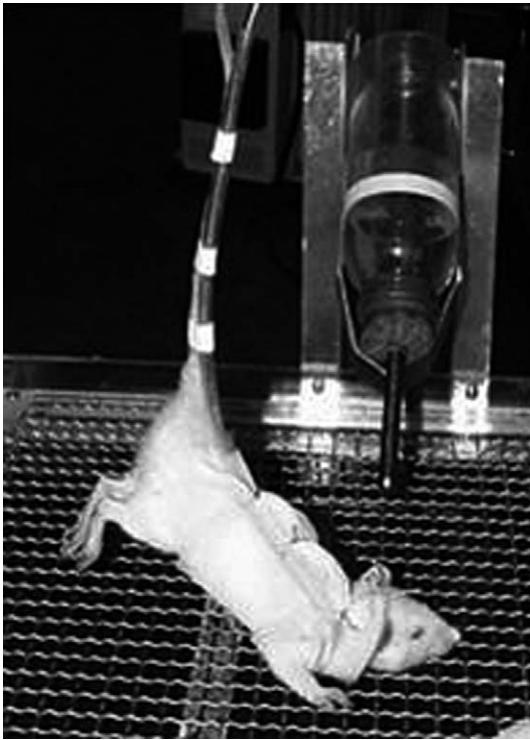


Fig. 1. Hindlimb suspension method.

격을 가하는 동안 직장체온이 41.5℃ 이상 올라가지 않도록 제한하였으며, 3주간의 하지현수기간 동안 각 실험동물에 적용할 열 충격을 주 3회로 조절하였다. 항산화제로는 비타민 E를 사용하였으며 매일 1회 투여하였다. 비타민 E의 투여는 Appell 등¹⁾의 방법을 수정하여 α -tocopherol acetate(60 mg/kg)를 10% polyoxyethylene hydrogenated castor oil 및 10% propylene glycerol (sodium citrate 완충액)에 용해시킨 뒤 체중의 0.5%에 해당되는 양(ml)을 취해 Zonde 주사기로 경구투여 하였다.

6주령의 Sprague-Dawley 흰쥐(무게 106 ± 26 g) 60마리를 각 군 당 6마리씩 10개의 군에 배정하여 하지현수법을 이용한 무부하(unloading) 및 재부하(reloading) 상황을 얻음으로써 하중부하의 변화 및 체액의 재분배를 유도하였다. 실험동물은 하지현수 상태로 3주 혹은 하지현수 후 재부하 상태를 경험하는 동안 열 충격 및 항산화제의 투여방법 차이에 따라 세분화하였다(Table 1). 에테르 흡입마취 하에 실험동물을 희생시키고 근위 경골 성장판을 포함한 슬관절 부위를 적출하였다. 적출된 조직을 4% paraformaldehyde로 고정하고 2주간 10% ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) 용액에서 탈회한 후 통상적인 방법으로 파라핀 포매 하였다. 4 μ m 두께로 자른 후 silane coating slide (MUTO PURE CHEMICALS CO., LTD, Japan)를 사용하여 고정하였으며 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 광학현미경 하에서 관찰하였다.

1. 세포증식도 및 세포고사도 측정

-20℃에서 보관된 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, SIGMA, St. Louis, MO, USA)을

Table 1. Grouping of Sprague-Dawley rats

	Control	Unload/ Reload	HS	AO	HSAO
Unloading	C group	Unloading 3W	Unloading+HS	Unloading+AO	Unloading+HSAO
Reloading	CR group	Reloading 1W	Reloading+HS	Reloading+AO	Reloading+HSAO

C: control to unloading, CR: control to reloading, Unloading: unloading for 3 weeks, Reloading: reloading for 1 week, HS: application of heat shock, AO: application of antioxidant, HSAO: application of heat shock and antioxidant.

phosphated buffered saline (PBS)에 녹여 실험동물 희생 각각 25시간 전과 1시간 전, 2회씩 복강 내 주사(100 mg/kg)하였다. BrdU 면역조직 화학염색을 위해 통상적인 방법으로 슬라이드를 제작하여 60℃에서 1시간 동안 파라핀을 녹인 후 다시 xylen으로 10분씩 3번 처리하였으며 함수를 위하여 100, 90, 70% 에틸알코올 및 이차증류수로 수세하였다. 3% hydrogen peroxide (H_2O_2)로 조직 내 내인성 peroxidase를 불활성 시킨 후 proteinase K (SIGMA, St. Louis, MO, USA)로 10분간 조직을 반응시켰다. 2N HCl로 30분간 DNA변성 후 5:1로 희석된 goat serum (SIGMA, St. Louis, MO, USA)과 반응시켰으며 BrdU 일차항체(SIGMA, St. Louis, MO, USA)로 실온에서 12시간 반응시켰다. Avidin-biotin (mouse IgG, extra avidin; SIGMA, St. Louis, MO, USA)방법을 이용하여 면역조직화학염색법을 수행하였으며, goat serum에서 일차 항체 단계를 제외한 각 단계에서 PBS 용액으로 수세하였다. 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)으로 발색하고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 수행하였으며 70, 90, 100% 에틸알코올에서 탈수하고 봉입하여 광학현미경 하에서 관찰하였다. BrdU 면역조직 화학검사는 각 슬라이드에서 임의로 세 부분을 지정하여 80 $\mu m \times 150 \mu m$ 크기의 사각형에 해당하는 성장판 증식대내의 전체 세포 수에 대한 염색된 세포 수를 측정하여 양성세포율을 계산하였다¹²⁾.

근위 경골 골성장판내 세포고사 관찰(biotin nick end labeling TUNEL assay)을 위해 각 조직슬라이드를 Tris-HCl용액(pH 8.0)에서 10분 동안 전처리 하고 20분간 proteinase K로 처리하였다. PBS 용액으로 수세 한 뒤 3% H_2O_2 로 조직에 있는 peroxidase를 불활성 시킨 후 PBS로 다시 수세하였다. 면역조직화학적 관찰을 위한 양성 대조군에 대해 DNA buffer로 10분간 전처리하고 DNase I (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland)으로 20분간 반응시켜 인위적으로 DNA를 단편화시켰다. Transferase-mediated deoxyuridine triphosphated (TdT, SIGMA, St. Louis, MO,

USA) buffer에서 15분간 전 처리한 후 terminaldeoxytransferase와 Biotin-16-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate (dUTP, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland)로 37℃에서 2시간 30분 동안 반응시켜 dUTP를 표지하였고, 음성 대조군에서는 terminaldeoxytransferase 효소를 처리하지 않았다. TB buffer에서 10분간 담가서 반응을 중지시킨 후에 2% Bovine serum albumin (BSA, SIGMA, St. Louis, MO, USA)로 15분간 blocking 하였고, PBS로 수세 후 streptavidin-peroxidase (SIGMA, St. Louis, MO, USA)로 30분간 반응시켜 DAB로 발색시켰다. 대조 염색은 nuclear fast red를 이용하였으며 다시 70, 90, 100% 에틸알코올로 탈수하여 봉입하였다. TUNEL assay에 양성인 세포는 각 슬라이드에서 임의로 세 부분을 지정하여 80 $\mu m \times 150 \mu m$ 크기의 사각형내의 전체 세포 수와 염색된 세포의 수를 측정하였고 성장판의 각 부위별로 양성세포율을 계산하였다¹²⁾.

2. Heat shock protein 47(HSP 47), Indian-hedgehog (Ihh) 및 Vascular endothelial growth factor (VEGF) 면역조직화학염색

통상적인 방법으로 슬라이드를 제작하여 60℃에서 1시간 동안 파라핀을 녹인 후 다시 xylen으로 10분씩 3번 처리하였으며, 함수를 위하여 100, 90, 70% 에틸알코올 및 이차 증류수로 수세하였다. 3% hydrogen peroxide (H_2O_2)로 내인성 peroxidase를 불활성 시킨 후 blocking serum으로 실온에서 10분간 반응한 뒤, HSP47 일차 항체(HSP47, Stress gene, Victoria, Canada), Ihh 일차 항체(Santa cruz, California, USA) 및 VEGF 일차 항체(Santa cruz, California, USA)로 37℃에서 2시간 반응시켰다. Ihh에 대해서는 hyaluronidase (Worthington chemical)로 37℃에서 한 시간 동안 반응시켜 epitope을 노출시킨 후 일차 항체와 반응시켰다. Avidin-biotin (Zymed Histo Plus kit, San Francisco, CA, USA)방법을 이용하여 면역조직화학염색을 수행하였으며 blocking serum에서 일차 항체 단계를 제외한

각 단계에서 PBS용액으로 수세하였다. 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)으로 발색하고 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색을 수행하였고 70, 90, 100% 에틸알코올에서 탈수하고 봉입하여 광학현미경 하에서 발현 정도를 관찰하였다.

3. 조직형태학적 계측 및 결과 분석

무부하와 재부하 및 무부하와 재부하군에 각각 열 충격, 항산화제를 단독으로 처리한 군 및 열 충격과 항산화제를 동시에 처리한 군의 골성장판 전체 높이와 정지대(resting zone), 증식대(proliferation zone) 및 과성장대(hypertrophic zone) 각각의 높이를 Imagepro® program (MediaCybernetics, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 측정하였다. 모든 조직학적인 관찰은 임의로 네 부분을 선정하여 수직으로 전체 높이를 측정하고 전체 높이에서 각 부위별 측정을 수행하

였으며, Wilcoxon signed rank test를 이용하여 $p=0.05$ 에서 통계학적 유의성을 결정하였다.

결 과

1. 각 군별 골성장판의 높이(vertical height) 비교

실험기간 동안 각 군별 골성장판 높이 변화의 경우, 무부하군 및 재부하군은 각각의 대조군에서의 골성장판 전체 높이(무부하 대조군: $382.9 \pm 11.7 \mu\text{m}$, 재부하 대조군: $324.5 \pm 13.8 \mu\text{m}$)보다 감소하여 각각 $77.6 \mu\text{m}$ 과 $42.3 \mu\text{m}$ 의 유의한 높이 차이를 보였으며, 단독으로 열 충격을 가하거나 항산화제만을 투여한 군에서도 대조군과 유의한 높이 차이를 관찰하였다. 한편, 무부하 후 열 충격과 항산화제 모두 투여한 군과 재부하 후 열 충격과 항산화제를 모두 투여한 군에서의 골성장판은 높이 감소가 관찰된 다른 실험군들과는 달리 대조군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 2, Table 2).

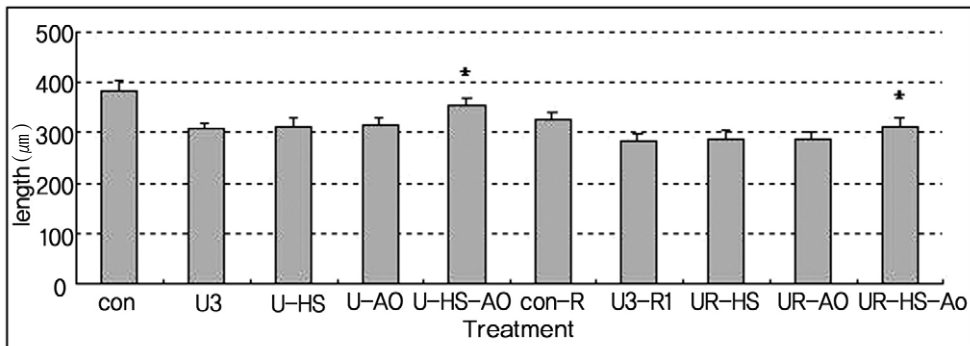


Fig. 2. Total length of growth plate (con: control to unloading, U3: unloading for 3 weeks, U-HS: unloading and application of heat shock, U-AO: unloading and application of antioxidant, U-HS-AO: unloading and application of heat shock and antioxidant, con-R: control to reloading, U3-R1: reloading for 1 week, UR-HS: reloading and application of heat shock, UR-AO: reloading and application of antioxidant, UR-HS-AO: reloading and application of heat shock and antioxidant, * $p>0.05$).

Table 2. Total length of the growth plate (μm)

	Control	Unloading3w/Reloading1w	Heat Shock (HS)	Antioxidant (AO)	HS+AO
Unloading group	382.9 ± 11.7	305.3 ± 14.2	314.2 ± 12.3	312.7 ± 13.3	352.6 ± 12.7
Reloading group	324.5 ± 13.8	282.2 ± 10.3	288.7 ± 9.8	286.9 ± 11.5	311.1 ± 7.9

2. BrdU 면역조직화학염색법을 통한 세포증식 관찰 및 세포고사도

세포 증식을 의미하는 BrdU 양성 연골세포는 모든 군에서 성장판내의 증식대에서 관찰되었고, 대조군은 각각 22.9%와 15.1%의 양성세포율을 나타내었다. 한편 무부하 및 재부하군, 열 충격 혹은 항산화물을 단독처리한 군들은 각각 13% 및 11%의 BrdU 양성세포율을 보여 대조군에 비해 각각 58.1%, 74.2%의 유의한 감소를 나타내었다. 그러나 열 충격과 항산화제를 동시에 처리한 군의 경우 각각 대조군의 82.5%와 96.7% 수준으로 회복되었음을 관찰하였다(Fig. 3, Table 3). 그러나 세포고사의 경우, 각 대조군의 세포고사도 31.9%와 32.9%와 비교하여 8개의 실험군에서의 세포고사율은 약 35% 전, 후로 측정되어 실험 조건에 따른 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 4, Table 4).

3. HSP 47, Ihh 및 VEGF 발현

HSP 47의 경우, 골성장판내 증식대와 상부 과성장대에서의 발현이 뚜렷하였으며, 무부하군이 대조군에 비해 상대적으로 강한 발현을 보였다. 재부하군의 경우, 단독으로 열 충격을 가한 군에서 강한 발현 양상이 관찰되었다(Fig. 5). Ihh는 골성장판내의 상부 과성장대에서 주로 발현되었으며 재부하군에서보다는 무부하군에서의 발현 정도가 상대적으로 낮았다. 각각의 대조군에서는 상대적으로 강한 발현을 관찰한 반면, 재부하군 및 재부하와 동시에 열 충격 혹은 항산화물을 처리한 군에서는 상대적으로 약한 발현이 관찰되었다(Fig. 6). VEGF는 골성장판내 하부 과성장대의 가장 아랫부분에서 주로 발현되었으며, 대조군에서의 강한 발현 양상에 비해 무부하군에서는 거의 발현되지 않았고 재부하군에서는 약한 발현을 보였다. 단독으로 열처리 혹은 항산화물을 처리한 군들에서도 혈관내피성장인자의 발현을 관찰할 수 있었

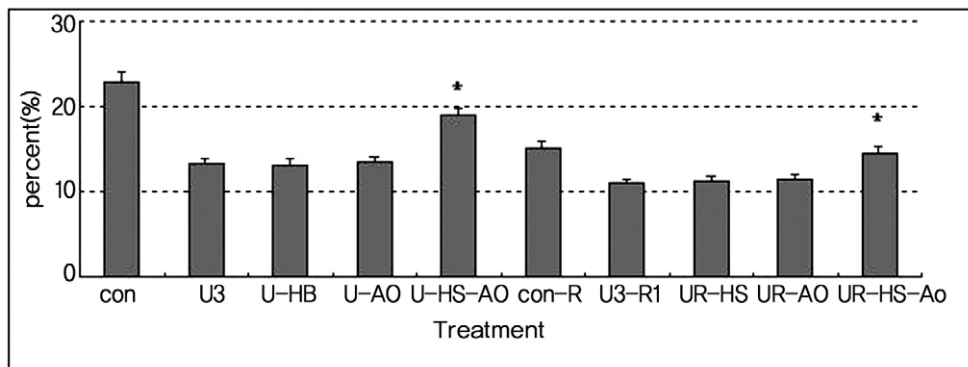


Fig. 3. Cell proliferation in growth plate (con: control to unloading, U3: unloading for 3 weeks, U-HS: unloading and application of heat shock, U-AO: unloading and application of antioxidant, U-HS-AO: unloading and application of heat shock and antioxidant, con-R: control to reloading, U3-R1: reloading for 1 week, UR-HS: reloading and application of heat shock, UR-AO: reloading and application of antioxidant, UR-HS-AO: reloading and application of heat shock and antioxidant, * $p < 0.05$).

Table 3. Cell proliferation in the growth plate (%)

	Control	Unloading3w/Reloading1w	Heat Shock (HS)	Antioxidant (AO)	HS+AO
Unloading group	22.9 ± 11.7	13.3 ± 14.2	13.1 ± 12.3	13.5 ± 13.3	18.9 ± 12.7
Reloading group	15.1 ± 13.8	11 ± 10.3	11.2 ± 9.8	11.4 ± 11.5	14.6 ± 7.9

Table 4. Apoptosis in the growth plate (%)

	Control	Unloading3w/Reloading1w	Heat shock (HS)	Antioxidant (AO)	HS+AO
Unloading group	31.9±8.7	35.8±10.2	36.1±9.9	35.7±11.4	33.9±13.3
Reloading group	32.9±11.4	36.3±9.6	35.9±10.3	36.0±10.5	34.8±8.2

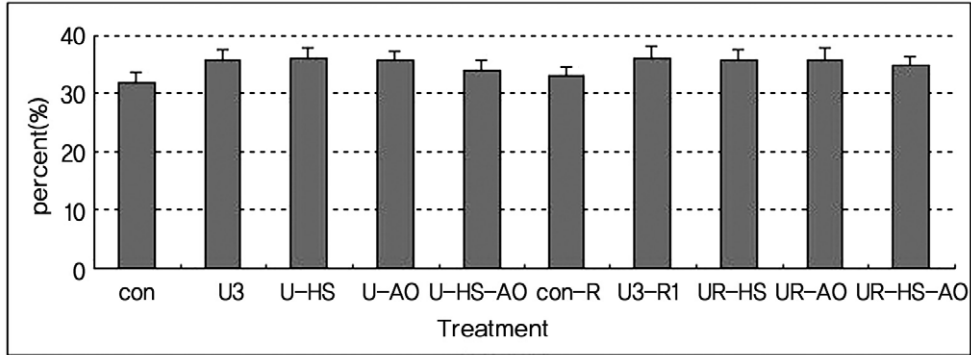


Fig. 4. Apoptosis in growth plate (con: control to unloading, U3: unloading for 3 weeks, U-HS: unloading and application of heat shock, U-AO: unloading and application of antioxidant, U-HS-AO: unloading and application of heat shock and antioxidant, con-R: control to reloading, U3-R1: reloading for 1 week, UR-HS: reloading and application of heat shock, UR-AO: reloading and application of antioxidant, UR-HS-AO: reloading and application of heat shock and antioxidant).

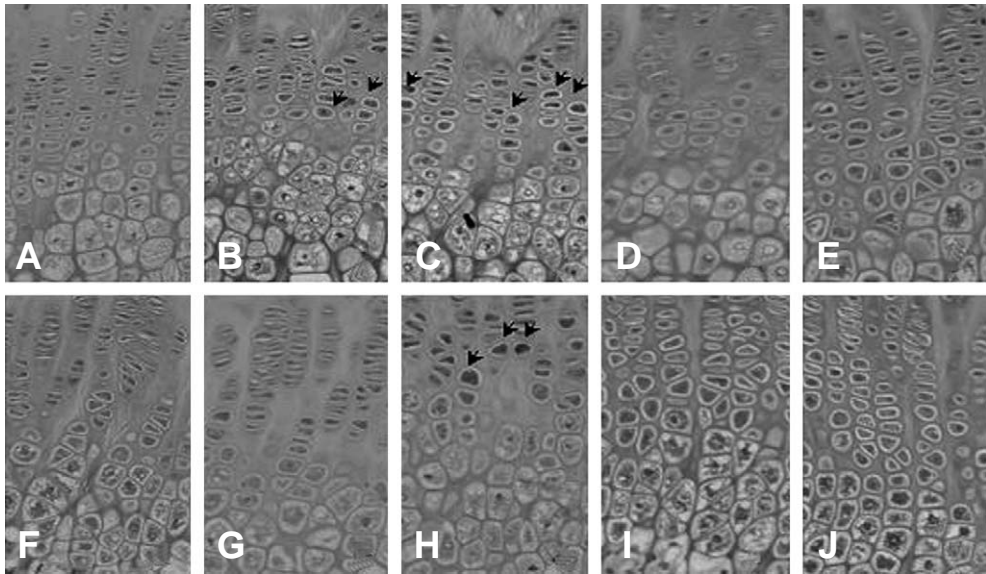


Fig. 5. Expression of Heat shock protein 47 in growth plate (A) Control to unloading, (B) Unloading for 3 weeks, (C) Unloading and application of heat shock, (D) Unloading and application of antioxidant, (E) Unloading and application of heat shock and antioxidant, (F) Control to reloading, (G) Reloading for 1 week, (H) Reloading and application of heat shock, (I) Reloading and application of antioxidant, (J) Reloading and application of heat shock and antioxidant, × 20.

으나 대조군과 비교하였을 때 낮은 발현이 관찰되었다. 열처리 및 항산화물을 동시에 처리한 군에서는 대조군과 비슷한 발현 정도를 보였다(Fig. 7).

고 찰

골성장판에서의 세포 활성도가 여러 호르몬, 국소 성장인자 등에 의해 조절된다는 것은 주지의 사실이나 실제 임상적으로는 이들 생물학적 요인에 의한 변화보다는 불가피한 상황에 의해 역학적 하중부하의 감소를 겪게 되는 경우가 더욱 흔하다. 또한 과거의 연구는 주로 역학적 하중변화에 따른 피질골 혹은 해면골에서의 골 기질 변화 등에 치우쳐왔으며, 역학적 하중 변화에 따른 골성장판내 연골세포 활성도의 변화 및 이의 가역성에 영향을 미치는 요인에 대한 연구는 미미하였다.

골성장판내 연골세포의 증식, 과성장 및 사멸로

의 전환 과정 중 세포역동성을 인지하기 위한 여러 관찰방법 중 본 연구에서는 세포증식력을 측정하기 위한 BrdU 면역조직화학염색법과 세포고사를 관찰하기 위한 TUNEL assay를 수행하였다. 본 연구에서 측정된 골성장판내 세포증식도는 각각의 대조군에서 22.9%와 15.1%로 측정되어 주령이 늘어남에 따라 증식률이 낮아짐을 관찰하였다. 또한 실험군인 무부하군과 재부하군 및 열 충격과 항산화물을 단독으로 처리한 군들은 각각의 대조군에 비하여 각각 58.1%, 74.2%의 세포증식도를 보여 현저히 낮아지는 결과를 보인 반면, 열 충격과 항산화물을 동시에 처리한 군에서는 다른 실험군에서와는 달리 세포증식도가 정상에 근접하여 회복됨을 관찰하였다.

골성장판에서의 세포고사는 하부과성장대에서 연골세포 및 세포의 기질이 석회화 과정을 거치면서 골로 전환되는 과정 중 일어나는 생리적인 변

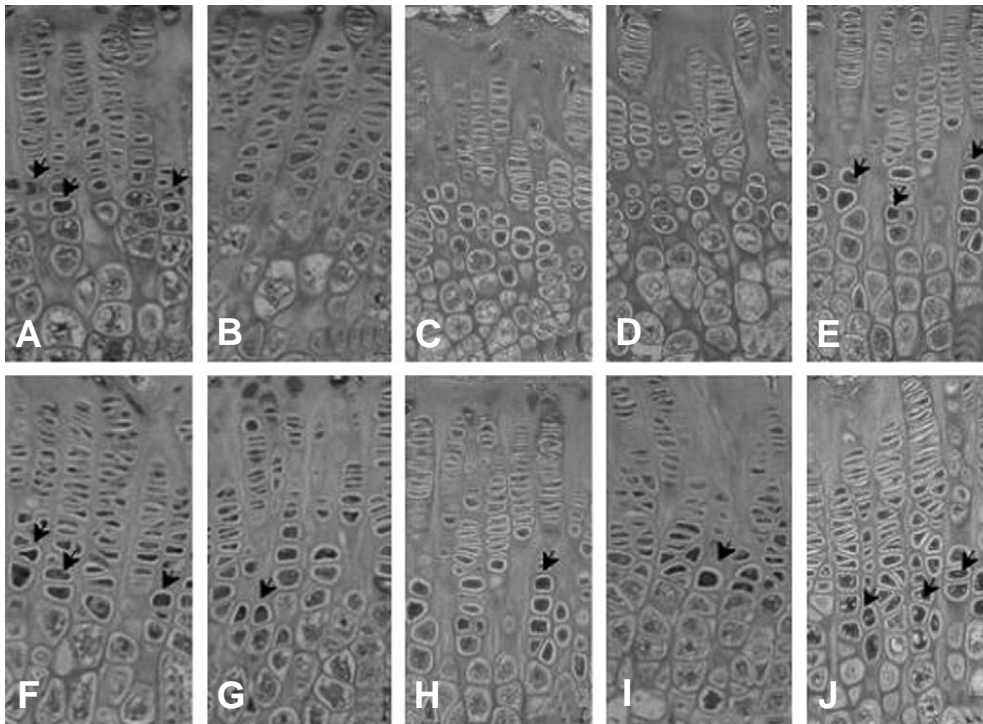


Fig. 6. Expression of Indianhedgehog in growth plate (A) Control to unloading, (B) Unloading for 3 weeks, (C) Unloading and application of heat shock, (D) Unloading and application of antioxidant, (E) Unloading and application of heat shock and antioxidant, (F) Control to reloading, (G) Reloading for 1 week, (H) Reloading and application of heat shock, (I) Reloading and application of antioxidant, (J) Reloading and application of heat shock and antioxidant, $\times 20$.

화로써^{5,6,19,25)} 정상적인 골로 대체되는 정도를 인지할 수 있다. 이와 같이 골성장판에서 정상적으로 일어나는 세포고사는 여러 가지 원인에 의해 이차골화중심에서 괴사 혹은 성장장애가 발생하는 경우 그 정도가 변할 수 있으며^{11,19,21)}, 저자들은 체중부하의 변화 및 이에 관여될 수 있는 인자의 영향에 따른 골성장판내에서의 세포고사 정도를 관찰하고자 하였다. 본 연구 결과, 대조군 및 실험군 모두에서 약 35% 전후의 고른 세포고사율을 보였으나 대조군 및 항산화물을 동시에 처리한 군에서는 하부 과성장대를 중심으로 세포고사가 주로 발생한 반면, 실험군에서는 골성장판내 모든 부위에서 고른 세포고사가 이루어졌음을 관찰하였다. 또한 실험군 및 단독으로 열 충격 혹은 항산화물을 처리한 군에서는 골성장판내 세포들의 사멸이 증가함을 관찰할 수 있었다.

세포고사 이외에도 여러 성장인자들이 연골내골화에 관여하는 것으로 제시된 바 있으며 이중

VEGF는 특히 골성장판 과성장대에서 골세포로의 분화에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다^{7,8,14,17,23)}. 이는 골성장판내 과성장대 및 석회화대 연골세포에서 생성되며, 수용체는 혈관내피세포(endothelial cell) 뿐만 아니라 파연골세포(chondroclast) 및 골모세포에도 존재한다고 알려져 있다⁷⁾. Gerber등은 연골내골화 과정에서 혈관내피성장인자의 기능을 알아보기 위해 혈관내피성장인자 제 1수용체(Flt-(1-3)-IgG)를 이용하여 혈관내피성장인자의 작용을 억제한 후 조직학적 변화를 관찰하였는데, 하부 과성장대로의 혈관유입이 결여되고 동시에 망상골의 형성이 억제되며 과성장대가 넓어지고 파연골세포의 유입 및 분화 억제, 연골세포의 흡수 등을 보고하였다⁸⁾. 또한 혈관내피성장인자가 발현되는 주변에서 연골내골화의 진행이 정상적이었던 것으로 보아 혈관내피성장인자로 조절되는 신생혈관의 유입은 연골내골화 과정과 연골 재형성에 필수적인 과정임을 의미

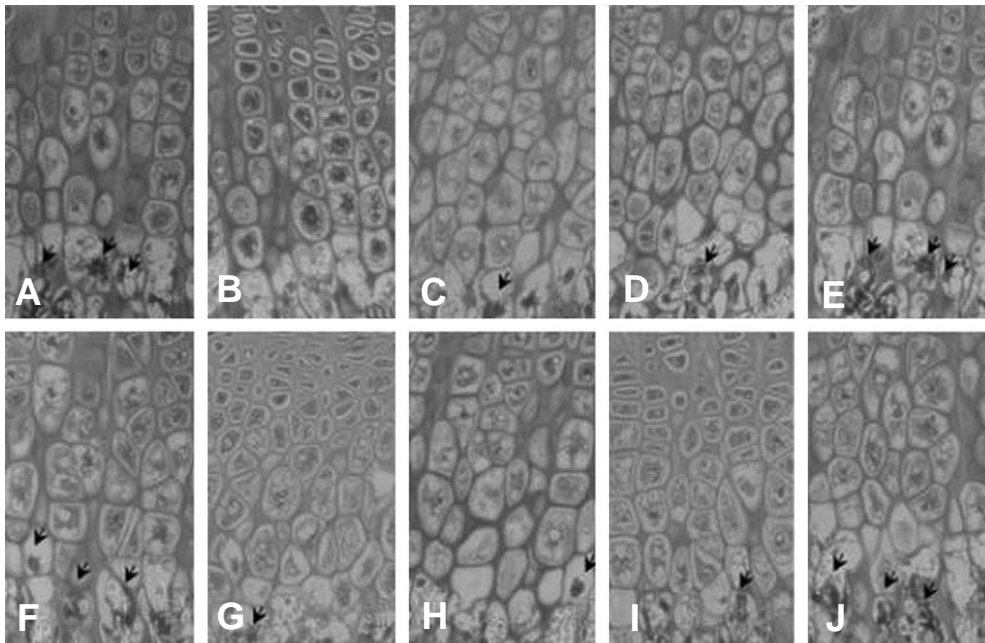


Fig. 7. Expression of Vascular endothelial growth factor in growth plate (A) Control to unloading, (B) Unloading for 3 weeks, (C) Unloading and application of heat shock, (D) Unloading and application of antioxidant, (E) Unloading and application of heat shock and antioxidant, (F) Control to reloading, (G) Reloading for 1 week, (H) Reloading and application of heat shock, (I) Reloading and application of antioxidant, (J) Reloading and application of heat shock and antioxidant, $\times 20$.

한다. 본 연구 결과, 대조군에서 혈관내피성장인자의 강한 발현이 있었고 무부하군에서는 거의 발현되지 않은 것으로 보아 체중부하의 결여는 정상적인 연골내골화에 부정적인 영향을 끼침을 알 수 있었다. 한편, 재부하군 및 단독으로 열처리 혹은 항산화물을 처리한 군들에서 관찰된 혈관내피성장인자의 발현 양상이 비록 정상적인 발현정도와는 차이가 있었지만 골성장판내 연골세포의 활성이 일부 회복되었음을 의미하였고, 열처리 및 항산화물을 동시에 처리한 군에서는 대조군과 가장 비슷한 발현정도를 보였던 것은 이들의 처리가 보다 정상적인 세포역동성에 기여함을 시사 한다고 할 수 있다.

Ihh는 전구 과성장연골세포(prehypertrophic chondrocytes)에서 분비되어 소위 “perichondrium cell signal”에 관여하며 부갑상선호르몬(Parathyroid Hormone, PTH) 및 Parathyroid Hormone-related protein(PTHrP)의 발현을 유도하여 연골세포 비대화(hypertrophy)로의 분화가 억제되도록 유도하는 “negative feedback” 작용을 한다. Ihh signalling은 PTHrP signalling과 더불어 연골세포의 과성장대로의 분화에 관여할 뿐만 아니라 연골세포의 증식 및 골모세포의 성숙에도 작용한다^{3,13)}. 시험관내 실험에서 Ihh가 골수간엽줄기세포에서 골아세포로의 분화를 촉진한다는 보고가 있었으며, Ihh knock-out mouse 모델에서 대조군보다 골의 길이가 월등히 짧거나 형성하지 못하는 연구 결과를 미루어 볼 때 Ihh가 골 형성에 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있다. 본 연구에서는 정상인 대조군 및 열 충격과 항산화물을 동시에 처리한 군에서 Ihh의 발현을 관찰한 반면, 무부하군에서 가장 낮은 발현양상을 보였으며 재부하군 및 단독으로 열 충격 혹은 항산화물을 처리한 군에서 발현정도가 낮은 양상으로 관찰되었다. 이는 열 충격과 항산화물을 동시에 처리할 경우 정상적인 골성장판의 성장 메커니즘 혹은 연골세포의 활성 유지에 가장 근접함을 반영한다고 할 수 있다.

골격계의 성장판에서 HSP는 세포고사로부터의 보호와 더불어 단백질 생합성 동안 “chaperone”을 활성화시키는 기능을 하며 그 예로 aggrecan G3 domain의 chaperone인 HSP27이 있다. 이

는 세포고사가 주로 이루어지는 하부 과성장대에서만 관찰되며 제 1형 교원질의 chaperone인 HSP47은 새로운 골 형성시 해면골내 골모세포의 주변 및 스트레스를 받는 골성장판내 전구 과성장 연골세포에서 발현된다. 본 연구에서는 HSP의 발현 정도와 세포기능 간의 상관관계, 단백질의 발현과 세포손상과의 관계를 분석함으로써 세포손상은 억제되면서 그 기능은 최대한 증가될 수 있는 조건을 찾고자 하였다. 이를 위해 무부하 상태에서 나타나는 HSP의 발현정도와 세포분열정도, 고사과정을 겪게 되는 연골세포의 변화를 관찰하고 이들 변화의 가역성을 관찰하여 골세포의 활성을 촉진시키는 방법을 알아보려 하였다. 세포가 열 충격을 받게 되면 HSP72는 세포 보호와 더불어 다른 단백질 생성 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{2,15)}. 본 연구에서 HSP47의 경우, 무부하군 및 단독으로 열 충격을 가한 군에서 가장 강한 발현양상을 보였는데 이는 무부하 및 열 충격이 골성장판내 연골세포가 갖는 정상적인 세포역동성에 역행하는 결과를 초래함을 의미한다고 할 수 있다. 향후 본 동물실험 수준의 결과를 토대로 연골세포에 열 충격을 가해서 발생하는 변화 기전에 대한 세포 수준에서의 실험이 필요할 것으로 사료된다.

결 론

백서의 골성장판에서 체중부하 변화에 따른 연골세포의 활성 변화를 관찰하고 이에 영향을 미칠 수 있는 열 충격과 항산화물을 투여하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 3주간의 체중부하 결여로 인한 변화로 골성장판 높이의 단축, 골성장판내 연골세포의 세포증식력 저하, Ihh와 혈관내피성장인자의 발현 저하, 세포손상으로 인한 HSP47의 발현 증가 등이 관찰되었다. 체중부하 결여로 인한 연골세포의 활성 저하에 대한 치유방법으로 열 충격과 항산화물을 적용하였으며, 열 충격 혹은 항산화물을 단독으로 처리한 실험군에서 무부하로 인하여 저하된 연골세포 증식도, Ihh 및 VEGF의 발현 증가에 유의한 영향을 미치지 않았다. 열 충격 함께 항산화물을 동시에 처리한 군의 경우, 골성장판의 높이가 대조군에 근접하게 회복 되었

으며 골성장판내 연골세포의 세포증식도 역시 무부하로 인한 저하가 억제되었다. Ihh와 혈관내피 성장인자의 발현은 대조군과 유사한 발현 양상을 나타냄으로써 골성장판의 연골세포가 정상적인 역동성을 회복하였음을 시사 하였으며, 정상적으로 HSP이 발현되어 세포손상 억제에 효과적인 수 있음을 관찰하였다. 위의 결과로 보아 체중부하의 감소로 인한 연골세포의 활성 저하에 대한 열 충격과 항산화물의 적용은 연골세포의 기능 저하를 억제할 수 있는 하나의 대안이 될 수 있다고 사료 되었다.

REFERENCES

- 1) **Appell H-J, Duarte JAR, and Soares JM:** Supplementation of vitamin E may attenuate skeletal muscle immobilization atrophy. *Int J Sports Med*, 18: 157-160, 1997.
- 2) **Booth FW and Criswell DS:** Molecular events underlying skeletal muscle atrophy and the development of effective countermeasures. *Int J Sports Med*, 18: 265-269, 1997.
- 3) **Chung U:** Essential role of hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. *Endocr J*, 51: 19-24, 2004.
- 4) **Eberstein A and Eberstein S:** Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile? *Med Sci Sports Exerc*, 28: 1463-1469, 1996.
- 5) **Farnum C. and Wilsman N:** Determination of proliferative characteristics of growth plate chondrocyte by labeling with bromodeoxyuridine. *Calcif Tissue Int*, 52: 110-119, 1993.
- 6) **Galotto M, Campanile G, Robino G, Cancedda F, Bianco P and Cancedda R:** Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation to osteoblast-like cells and participate in the initial bone formation in developing chick embryo. *J Bone Miner Res*, 9: 1239-1249, 1994.
- 7) **Gerber H and Ferrara N:** Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med*, 10(5): 223-227, 2000.
- 8) **Gerber H, Vu T, Ryan A, Kowalski J, Werb Z and Ferrara N:** VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med*, 5(6): 623-628, 1999.
- 9) **Globus RK, Bikle DD and Morey-Holton E:** Effects of simulated weightlessness on bone mineral metabolism. *Endocrinology*, 114: 2264-2270, 1984.
- 10) **Globus RK, Bikle DD, Halloan B and Morey-Holton E:** Skeletal response to dietary calcium in a rat model simulating weightlessness. *J Bone Miner Res*, 1: 191-197, 1986.
- 11) **Hatori M, Klatte K, Yeixeira C and Sapiro I:** End labelling studies of fragmented DNA in Avian growth plate: evidence of apoptosis in terminal differentiation chondrocytes. *J Bone Miner Res*, 10: 1960-1968, 1995.
- 12) **Kang HJ, Kong SY, Park KB et al.:** Altered cellular kinetics in the growth plate according to alterations in the weight bearing. *J Korean Orthop Res Society*, 8: 50-58, 2005.
- 13) **Karsenty G:** Chondrogenesis just ain't what it used to be. *J Clin Invest*, 107: 405-407, 2001.
- 14) **Klagsbrun M and D' Amore PA:** Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 7(3): 259-270, 1996.
- 15) **Kregel, KC:** Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*, 92: 2177-2186, 2002.
- 16) **Lord-Fontaine S and Averill-Bates DA:** Heat shock inactivates cellular antioxidant defenses against hydrogen peroxide: protection by glucose. *Free Radic Biol Med*, 32: 752-765, 2002.
- 17) **Maes C, Carmeliet P, Moermans K et al.:** Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF and VEGF. *Mech Dev*, 111: 61-73, 2002.
- 18) **Matsumoto T, Nakayama K, Kodama Y, Fuse H, Nakamura T, and Fukumoto S:** Effect of

- mechanical unloading and reloading on periosteal bone formation and gene expression in tail-suspended rapidly growing rats. *Bone*, 22: 89-93, 1998.
- 19) **Matsuno T, Ishida O, Arihiro K, Sunagawa T, Mori T and Ikuta Y:** Cell proliferation and death of growth plate chondrocyte caused by ischemia and reperfusion. *Microsurgery*, 21: 30-36, 2001.
 - 20) **Mayr W, Bijak M, Girsch W et al.:** MYOS-TIM-FES to prevent muscle atrophy in microgravity and bed rest: preliminary report. *Artif Organs*, 23: 428-31, 1999.
 - 21) **Nagata S:** Apoptosis by death factor. *Cell*, 88: 355-365, 1997.
 - 22) **Naito H, Powers SK, Demirel HA, Sugiura T, Dodd SL, and Aoki J:** Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. *J Appl Physiol*, 88: 359-363, 2000.
 - 23) **Norman D, Reis D, Zinman C, Misselevich I and Boss JH:** Vascular deprivation-induced necrosis of the femoral head of the rats. An experimental model of avascular osteonecrosis in the skeletally immature individual or Legg-Perthes disease. *Int J Exp Pathol*, 79: 173-181, 1998.
 - 24) **Oishi Y, Ishihara A, Talmadge RJ et al.:** Expression of heat shock protein 72 in atrophied rat skeletal muscles. *Acta Physiol Scand*, 172: 123-130, 2001.
 - 25) **Vanky P, Brockstedt U, Hjerpe A and Wikström:** Kinetic studies on epiphyseal growth cartilage in the normal mouse. *Bone*, 22: 331-339, 1998.
 - 26) **Vico L, Lafage-Proust MH, and Alexandre C:** Effects of gravitational changes on the bone system in vitro and in-vivo. *Bone*, 22: 95-100, 1998.
 - 27) **Weinberg J, D'Alquen G, Bezio S:** Interactive effects of ethanol intake and maternal nutritional status on skeletal development of fetal rats. *Alcohol*, 7: 383-8, 1990.
 - 28) **Zerath E, Holy X, Moullon JM, Farbos B, Machwate M, and Andre C:** TGF- β 2 prevents the impaired chondrocyte proliferation induced by unloading in growth plates of young rats. *Life Sci*, 61: 2387-2406, 1997.